

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号	12601
研究種目	若手研究(B)
研究期間	2011~2012
課題番号	23791105
研究課題名(和文)	JAK阻害薬による新規制御性T細胞誘導機構の解明及び炎症性疾患治療への応用
研究課題名(英文)	Induction of novel regulatory T cells by JAK inhibitor and its application for inflammatory disease treatment
研究代表者	
	岡本 明子 (OKAMOTO AKIKO)
	東京大学・保健・健康推進本部・助教
	研究者番号: 40431861

研究成果の概要(和文): 自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウスのNZB/W F₁ (BWF₁)マウス脾臓では、抗体産生を抑制するLAG3⁺制御性T細胞の割合が減少していた。JAK阻害薬Tofacitinibを加えてコントロールのC57/BL6(B6)マウスやBWF₁マウスのCD4⁺T細胞を培養すると、LAG3⁺Treg様の表現型を示した。BWF₁マウスのLAG3⁺Treg様細胞はSLE症状の発症を抑制した。関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導性関節炎を発症するDBA1Jマウスも脾臓LAG3⁺Tregの割合が減少していた。Tofacitinibによって誘導されたDBA1JマウスのLAG3⁺Treg様細胞は、関節炎の進行と重症化を抑制した。LAG3⁺TregもしくはLAG3⁺Treg様細胞の分化機構の解明は、関節リウマチ・SLEなどの自己免疫疾患/慢性炎症性疾患の新規治療法開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文): We have recently identified a novel regulatory T cells (Treg) population that expresses lymphocyte activation gene-3(LAG3) and early growth response gene-2(Egr2). LAG3⁺Treg strongly suppress autoantibody production. Young DBA1J mice and lupus-prone NZB/W F₁ mice had fewer LAG3⁺Treg in the spleen compared with control B6 mice. We found that *in vivo* tofacitinib, a JAK inhibitor, treatment increased of CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ regulatory cells in the spleen of B6 mice. We found that tofacitinib, a JAK inhibitor, induces LAG3⁺Treg-like CD4⁺Egr2⁺T cells (Tofa T cells) *in vitro*. Tofa T cells suppressed autoantibody production and nephritis progression in BWF₁ mice. LAG3⁺Treg and Tofa-T cells significantly suppressed the progression of collagen induced arthritis (CIA) in DBA1J mice. Tofacitinib conferred the expression of regulatory molecules and *in vivo* suppressive function on CD4⁺T cells. The induction of LAG3⁺Treg would contribute the regulation of chronic inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード: JAK阻害薬 制御性T細胞 全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE) コラーゲン誘導性関節炎

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis;RA)

では滑膜炎および炎症性サイトカインの過剰産生がみられる。炎症性サイトカインを標

的とした生物学的製剤により、RA 治療は大きく発展したが、未だに寛解導入率は3-5割である。また、生物学的製剤は非常に高価で、投与経路は皮下注射または静脈注射である。内服可能で安価な抗リウマチ薬の開発が求められており、近年、Janus kinase(JAK)を標的とした阻害薬が高い治療効果と少ない副作用により着目されている (Kremer JM, et al. *Arthritis Rheum.* 60, 1895-1905, 2009)。JAK ファミリー(JAK1-3, TYK2)は、サイトカインによる生物活性の発揮に必須のチロシンキナーゼである。JAK はサイトカインが受容体に結合した後に細胞内で活性化され、その下流で転写因子 Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)を活性化する。Jak1, Jak2 は広範な組織にみられるが、Jak3 は血球系に限局して発現しているため、Jak3 阻害薬は最も副作用の少ない免疫抑制剤となりうる。JAK 阻害薬 tofacitinib は既存の JAK3 阻害薬の 1/1000 の濃度で効果を示す分子量 300Da の化合物である。tofacitinib は、マウスコラーゲン誘発性関節炎・ラットアジュバント誘発関節炎(ラット)に有効であり (Milici AJ, et al. *Arthritis research and Therapy.* 10: R14, 2008)、治療抵抗性関節リウマチ患者の臨床試験においても TNF 阻害薬に匹敵する高い有効性が示されている (Kremer JM, et al. *Arthritis Rheum.* 60, 1895-1905, 2009)。しかし tofacitinib の免疫系での作用点は未だ分かっていない。

研究協力を得ている東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科第 18 研究室では、平成 21 年に CD4⁺CD25⁺LAG3⁺T 細胞 (以下 LAG3⁺Treg) を同定した。LAG3⁺Treg は (1) T 細胞レセプター (TCR) 刺激に対しアナジーである (2) IL-10 を高産生する (3) マウスの腸炎を IL-10 依存性に抑制する (4) Foxp3 に依存しない、といった特徴をもつ。C57BL/6 マウス (以下 B6 マウス) で脾臓 CD4⁺T 細胞の 2%、パイエル板 CD4⁺T 細胞の 7%程度に存在する。LAG3⁺Treg は、IL-10・LAG3 遺伝子と共にアナジーに関連する転写因子 early growth response gene-2 (Egr2) を高発現し、Egr2 は CD4 陽性 T 細胞に LAG3 を発現させ、IL-10 産生を促進させる (Okamura T, et al. *PNAS.* 106:13974-13979, 2009)。T 細胞特異的 Egr2 欠損マウスが全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus ; SLE) 様病態を呈することも報告された (Zhu et al, *J Exp Med.* 2008, 205:2295-2307)。理化学研究所との共同研究により Egr2 は RA および SLE 感受遺伝子の一つであることが判明し

(Myouzen K, et al. *Hum Mol Genet.* 2010, 19:2313-20.)、RA や SLE の発症機序への関与が示唆された。

LAG3⁺Treg は養子移入によりマウス腸炎モデルの発症を抑制する。さらに、自然発症 SLE モデルマウスである MRL/lpr マウスに LAG3⁺Treg を養子移入すると、自己抗体産生と腎炎進行が抑制されるが、同数の CD4⁺CD25⁺T 細胞の養子移入ではこうした治療効果は見られない (岡村僚久ほか 2010 年国際免疫学会 ポスター発表)。LAG3⁺Treg は自己免疫反応を制御する重要な細胞サブセットと考えられ、生体内で増やすことにより、SLE をはじめとする自己免疫疾患や炎症性腸疾患の制御が期待される。Mayack らが JAK3^{-/-}マウスの CD4⁺T 細胞は IL-10, LAG3 を発現すると報告しているため (Mayack SR, et al. *Journal of Immunology.* 176:2059-2063, 2006)、JAK 阻害薬である tofacitinib は LAG3⁺Treg を誘導するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

他疾患への応用可能性を検討しつつ、tofacitinib が LAG3⁺Treg に与える影響および LAG3⁺Treg の誘導機構を解明し、tofacitinib 自体を含めた炎症性疾患の新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

SLE を自然発症しない B6 マウスを用いて、tofacitinib の投与が LAG3⁺T 細胞に与える影響を解析する。安定した薬物動態を保つため、tofacitinib の投与は浸透圧ポンプを皮下に埋め込んで行う。tofacitinib 投与群と非投与群の B6 マウスの脾臓細胞を CD4⁺CD25⁻CD45RB^{hi}, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺LAG3⁺ (LAG3⁺Treg), CD4⁺CD25⁺LAG3⁻ 分画に分けてソーティングし、IL-10, Egr2 などの mRNA 発現を real time PCR で比較検討した。Tofacitinib 添加下でナイーブ CD4⁺T 細胞を培養し、フローサイトメトリーで表面分子や Egr2 発現を検討した。腎炎発症前の BWF₁ マウスや関節炎発症直前の DBA1J マウスに tofacitinib 添加下に培養した CD4⁺T 細胞を移入し、腎炎や関節炎の発症が抑制されるか検討した。

4. 研究成果

BWF₁ マウスと B6 マウスの脾臓細胞を解析したところ、B6 マウスと比較して、BWF₁ マウスでは脾臓 CD4⁺T 細胞内での LAG3⁺Treg の割合が減少していた。B6 マウスと BWF₁ マウスの LAG3⁺Treg の Egr2, LAG3, IL-10 の mRNA 発現パターンには差異を認めず、LAG3⁺Treg の減

少がグループ発症に寄与する可能性が示唆された。Tofacitinib 添加下で B6 もしくは BWF₁ マウスのナイーブ CD4⁺T 細胞を培養すると、Egr2 を発現し、LAG3⁺Treg 様の表現型を示した。BWF₁ マウスの LAG3⁺Treg 様細胞を腎炎発症前の同系マウスに養子移入すると自己抗体産生・腎炎発症が抑制された。コラーゲン誘導性関節炎を発症する DBA1J マウスでも脾臓 CD4⁺T 細胞内での LAG3⁺Treg の割合は減少していた。Tofacitinib によって誘導された DBA1J マウスの LAG3⁺Treg 様細胞を II 型コラーゲンで免疫した同系マウスに移入したところ、関節炎の進展と重症化が抑制された。LAG3⁺Treg 分化機構のさらなる解明は、関節リウマチ・SLE などの自己免疫疾患の新規治療法開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Okamoto A, Fujio K, Okamura T, Yamamoto K. Regulatory T cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus. J Biomed Biotechnol. 査読有. 2011, 2011, 463412

②Shoda H, Fujio K, Shibuya M, Okamura T, Sumitomo S, Okamoto A, Sawada T, Yamamoto K. Detection of autoantibodies to citrullinated BiP in rheumatoid arthritis patient and pro-inflammatory role of citrullinated BiP in collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 査読有. 2011, R191

③岡本明子 PAD4 に対する免疫応答は関節リウマチ発症に先行する リウマチ科 査読無 2011, 46, 62-66

④Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K Kidney-infiltrating T cell clones promote nephritis in lupus-prone mice Kidney Int. 査読有 2012, 8, 969-79

[学会発表] (計 7 件)

①岡本明子、藤尾圭志ほか NZB/W F1 SLE モデルマウスにおける CD4⁺CD25⁻LAG3⁺制御性 T 細胞の修飾因子の検討 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011 年 7 月 18 日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

②Akiko Okamoto, Keishi Fujio, Kazuhiko Yamamoto Contribution of a

kidney-infiltrating CD4⁺ T cell clone to nephritis in lupus-prone mice. 2011 ACR Annual Meeting 2011 年 11 月 6 日 McCormick Place West (アメリカ・シカゴ)

③岡本明子、藤尾圭志、松本巧ほか Tofacitinib は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4⁺T 細胞の Egr2 発現を促進する 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2012 年 4 月 26 日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京都)

④岡本明子、藤尾圭志、松本巧ほか Tofacitinib はマウス生体内で CD4⁺CD25⁻LAG3⁺T 細胞を誘導し、試験管内で CD4⁺T 細胞の Egr2 発現を促進する 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012 年 7 月 6 日 ホテル日航福岡 (福岡県)

⑤岡本明子、藤尾圭志、松本巧ほか Jak 阻害薬は生体内で CD4 陽性 CD25 陰性 LAG3 陽性制御性 T 細胞を誘導し、試験管内で CD4⁺T 細胞の Egr2 発現を誘導する 第 40 回日本臨床免疫学会総会 2012 年 9 月 27 日 京王プラザホテル(東京都)

⑥Okamoto A, Fujio K, Shibuya M, Okamura T, Yamamoto K CONTRIBUTION OF A KIDNEY-INFILTRATING CD4⁺ T CELL CLONE TO NEPHRITIS IN MRL/LPR MICE 8th International Congress on Autoimmunity 2012 2012 年 05 月 11 日 Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada (スペイン・グラナダ)

⑦Okamoto A, Fujio K, Matsumoto T, Ishigaki K, Okamura T, Yamamoto K Tofacitinib induces CD4⁺CD25⁻LAG3⁺ regulatory T cells in vivo and the expression of Egr2 in CD4⁺ T cells in vitro 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 6 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 明子 (OKAMOTO AKIKO)
東京大学・保健・健康推進本部・助教
研究者番号：40431861

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：